

· 药学前沿 ·

靶向 MLL1-WDR5 蛋白-蛋白相互作用抑制剂的研究进展

陈鑫^{1,2#}, 杨倩^{2#}, 尤启冬^{1,2*}, 郭小可^{1,2**}

(¹中国药科大学江苏省药物分子设计与成药性优化重点实验室, 南京 211198; ²中国药科大学药学院, 南京 211198)

摘要 Mixed lineage leukemia 1 (MLL1) 是组蛋白甲基转移酶 SET 家族的成员之一。MLL1 与 WDR5、RbBP5、Ash2L 和 DPY-30 组成 MLL1 甲基转移酶复合物调控组蛋白 H3 的第 4 位赖氨酸的甲基化水平, 对造血系统的发育和血细胞的更新至关重要。部分白血病患者体内存在因 *MLL1* 基因易位而产生的致癌蛋白——MLL1 融合蛋白, MLL1 融合蛋白在发挥其致癌作用时需要功能完整的 MLL1 酶复合物, 故靶向 MLL1-WDR5 的蛋白-蛋白相互作用成为治疗 MLL1 融合型白血病的潜在策略。本文对 MLL1-WDR5 蛋白-蛋白相互作用的生物学机制、结构信息以及抑制剂进行了系统的总结, 并结合已报道数据对该领域进行了展望, 以为后续研究提供参考。

关键词 组蛋白甲基转移酶; MLL1; 蛋白-蛋白相互作用; 小分子抑制剂; 进展

中图分类号 R914 **文献标志码** A **文章编号** 1000-5048(2022)02-0125-12

doi: 10.11665/j.issn.1000-5048.20220201

引用本文 陈鑫, 杨倩, 尤启冬, 等. 靶向 MLL1-WDR5 蛋白-蛋白相互作用抑制剂的研究进展[J]. 中国药科大学学报, 2022, 53(2): 125 - 136.

Cite this article as: CHEN Xin, YANG Qian, YOU Qidong, *et al.* Advances of inhibitors targeting MLL1-WDR5 protein-protein interaction [J]. *J China Pharm Univ*, 2022, 53(2): 125 - 136.

Advances of inhibitors targeting MLL1-WDR5 protein-protein interaction

CHEN Xin^{1,2#}, YANG Qian^{2#}, YOU Qidong^{1,2*}, GUO Xiaoke^{1,2**}

¹Jiangsu Key Laboratory of Drug Design and Optimization, China Pharmaceutical University, Nanjing 211198;

²School of Pharmacy, China Pharmaceutical University, Nanjing 211198, China

Abstract Mixed lineage leukemia 1 (MLL1) is a member of the "SET" histone methyltransferases family. MLL1 methyltransferase complex, consisting of MLL1, WDR5, RbBP5, Ash2L and DPY-30, regulates methylation level of histone H3 lysine 4 and is essential for the development of human hematopoietic system and self-renewal of blood cells. As an oncogenic protein produced by the translocation of *MLL1* gene, the MLL1 fusion protein has been found in some patients with leukemia. Complete MLL1 enzyme complex is required to perform histone demethylation effect, therefore, targeting the protein-protein interaction of MLL1-WDR5 has become a potential strategy for the treatment of leukemia induced by MLL1 fusion protein. This review systematically summarizes the biological mechanism, structural information and inhibitors of MLL1-WDR5 protein-protein interaction, with a perspective based on previously reported data, aiming to provide some reference for further investigation.

Key words histone methyltransferase; MLL1; protein-protein interaction; small molecule inhibitor; advances

This study was supported by the National Natural Science Foundation of China (No. 82173673, 82173673); and the Natural Science Foundation of Jiangsu Province (No. BK20191321)

收稿日期 2021-05-24 **通信作者** *Tel: 025-86185328 E-mail: youqd@163.com

**Tel: 025-86185328 E-mail: kexin95@126.com

基金项目 国家自然科学基金资助项目 (No. 82173673, No. 81872799); 江苏省自然科学基金资助项目 (No. BK20191321)

#陈鑫与杨倩为共同第一作者

*CHEN Xin and YANG Qian contributed equally to this work

表观遗传学是近年来生命科学界最热门的领域之一,其涉及的生物学活动覆盖了从胚胎发育到动物毛发颜色调节等各个环节。表观遗传还参与众多疾病的起始、发展和维持,如:糖尿病^[1]、精神疾病^[2]、肿瘤^[3]等。通过干涉表观遗传调节过程来调控疾病的发展受到药物化学家们的关注^[4-5]。表观遗传指的是DNA碱基序列不变的可遗传性状变化,包括DNA修饰、组蛋白修饰、非编码RNA修饰、染色质重组和核小体定位等^[6-7]。其中,组蛋白修饰包括甲基化、乙酰化、磷酸化和泛素化等。在众多组蛋白修饰中,组蛋白甲基化是研究最为深入的修饰之一^[8]。由于组蛋白甲基化异常,导致肿瘤相关的基因转录异常,是诱发肿瘤的重要因素^[9]。因此选择性靶向组蛋白甲基化过程、逆转基因的异常表达,成为治疗肿瘤的新策略之一。

SET1家族是负责调节组蛋白H3的第4位赖氨酸(H3K4)甲基化过程的蛋白家族,因其特有的SET结构域而得名。SET1家族可以通过将甲基载体S-5'-腺苷-L-蛋氨酸(SAM)上的甲基转移至H3K4而实现组蛋白的甲基化。SET1家族成员有MLL1-4(mixed lineage leukemia 1-4)、SET1a和SET1b,其中MLL1是研究最为深入的一个成员。研究发现,组蛋白甲基转移酶MLL1与多种肿瘤的发生、发展相关,成为近年来治疗肿瘤的热门靶标^[10-13]。目前,已有多种靶向MLL1甲基转移酶复合物的抑制剂被研究和开发,其中部分抑制剂已推进至临床研究阶段,如DOT1L(disruptor of telomeric silencing 1-like)抑制剂EPZ-5676^[14]和MENIN(multiple endocrine neoplasia type 1)抑制剂SNDX-5613^[15]。MLL1和WDR5(WD40 repeat 5)的蛋白-蛋白相互作用(protein-protein interaction, PPI)是MLL1甲基转移酶发挥正常生理功能的基础,近些年来成为药物分子研究的热点。本文主要针对MLL1-WDR5 PPI在肿瘤中的重要作用以及其抑制剂的进展进行系统总结,期望能为该领域研究人员提供参考。

1 MLL1-WDR5的生理功能

1.1 野生型MLL1(WT-MLL1)

MLL1又称组蛋白赖氨酸甲基转移酶2

(KMT2A),因其可诱发混合谱系白血病(mixed lineage leukemia)得名^[16]。MLL1在人体组织中广泛存在,编码MLL1的基因位于11q23染色体上。在MLL1基因被翻译后,全长MLL1蛋白在第2 666/2 667残基和第2 718/2 719处被taspase1切断,产生两个多肽(N端多肽和C端多肽,MLL-C和MLL-N),随后N端多肽和C端多肽分别通过FYRN和FYRC连接形成一个完整的活性MLL1蛋白(图1)^[17-22]。

MLL1的主要生物学功能是在胚胎发育、造血和神经发育过程中通过调节组蛋白H3K4的甲基化状态,维持下游Hox(homeobox)基因表达,而Hox基因在造血功能、干细胞自我更新等生理过程中起着重要作用^[23-24]。MLL1还能识别二甲基化和三甲基化的H3K4(H3K4me2和H3K4me3),招募MLL1到靶基因,进一步激活下游Hox基因的表达^[25-26]。在婴儿发育期间,MLL促进造血干细胞的分化,在成人体内,MLL帮助维持血细胞更新^[27]。此外,MLL1还参与了血管的生成^[28]、调控肿瘤抑制因子以及参与组织生长和发育相关基因的表达^[29]。

1.2 MLL1融合蛋白

混合谱系白血病基因(MLL gene)是三胸腺果蝇基因(*drosophila trithorax*)的同源基因^[30]。MLL基因可与其他基因重排,这种现象在白血病患者中广泛存在,约10%的白血病患者体内存在MLL基因重排现象^[31]。MLL基因重排与急性髓性白血病(AML)、淋巴性白血病(ALL)、双表型或混合性白血病的发生密切相关。MLL基因重排主要发生在1岁以下婴儿(主要为ALL)和中青年患者(主要为AML)中^[31]。MLL基因重排有两种类型:MLL基因特异性突变,包括基因内部缺失、部分序列重复串联(partial tandem duplications, MLL-PTD)或MLL全基因重复^[16,24,32];第二种是由于染色体易位导致11q23染色体(MLL基因)和其他染色体重组,产生MLL融合基因(MLL-FP)^[19]。MLL重排主要发生在MLL基因的RD和PHD结构域之间。MLL基因可与80多个不同的伴侣基因融合,融合的伴侣基因大多数都编码转录因子,诱发白血病的MLL融合蛋白主要来源于6个融合基因:MLL-AF4、MLL-

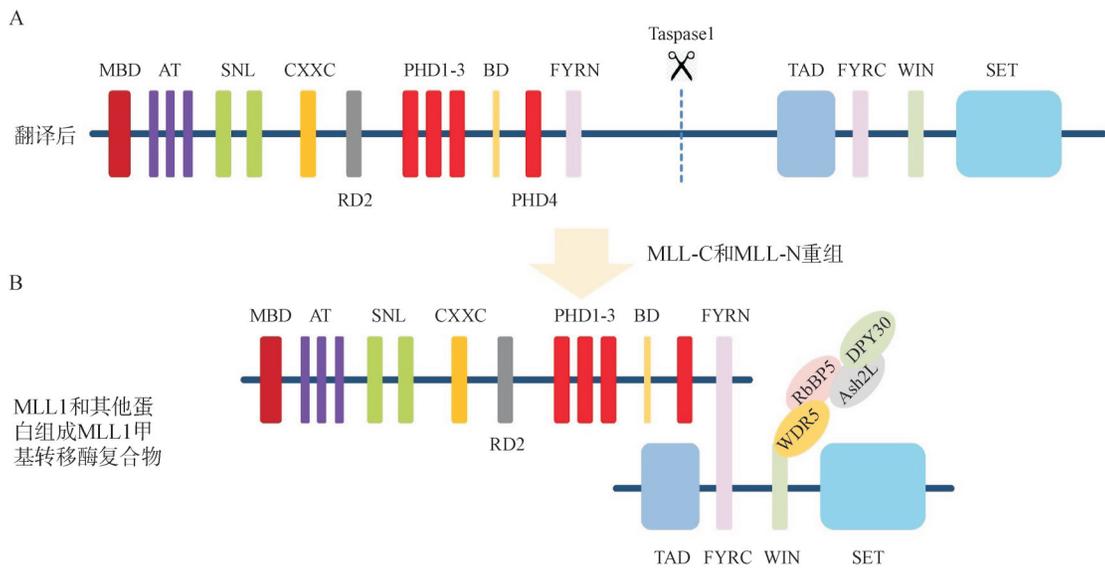


图1 MLL1 蛋白翻译后修饰和 MLL1 甲基转移酶复合物

A: 野生型全长 MLL1 蛋白; B: MLL1 被 taspase1 酶切后重新形成的成熟的野生型 MLL1 蛋白,然后和 WDR5、RbBP5 (retinoblastoma binding protein 5)、Ash2L (absent small or homeotic-2-Like) 和 DPY30 (Dumpy-30) 形成 MLL1 甲基转移酶复合物

MBD: 甲基结合结构域; AT: AT-钩; SNL: 斑点核定位; CXXC: Cys-Xaa-Xaa-Cys; RD2: 抑制结构域 2; PHD: 植物同源结构域; BD: 溴结构域; FYRC: F/Y-rich C; FYRN: F/Y-rich N; TAD: 转录激活结构域; WIN: WDR5 相互作用; SET: SET 结构域

AF6、MLL-AF9、MLL-AF10、MLL-ELL 和 MLL-ENL^[33]。MLL 融合蛋白缺乏 C 端 TAD、Win 和 SET 结构域,因此失去了 WT-MLL1-C 端的相关功能,缺乏 SET 结构导致 MLL-FPs 无法催化 H3K4 甲基化;在 WT-MLL1-N 结构中保留 AT-钩(AT-hook)结构域、CXXC 域、MBD 和 SNL,使其依然保留了识别和结合相关组蛋白甲基化标记的能力(图 1 和图 2)。然而,由于其他伴侣基因的融合,MLL-FPs 从伴侣

基因中获得新的功能^[19]。虽然 MLL-FPs 诱发肿瘤的机制尚未完全确定,但已有研究表明,部分 MLL-FPs 可以通过调节 RNA 聚合酶 II,诱导相关基因异常表达,继而诱发白血病^[34];MLL-FPs 还通过招募其他蛋白特异性激活下游基因表达,导致下游基因表达异常,进而诱导或促进白血病进程^[31,35-36]。总之,MLL-FPs 可以通过多种机制导致白血病的发生,维持白血病的发展。

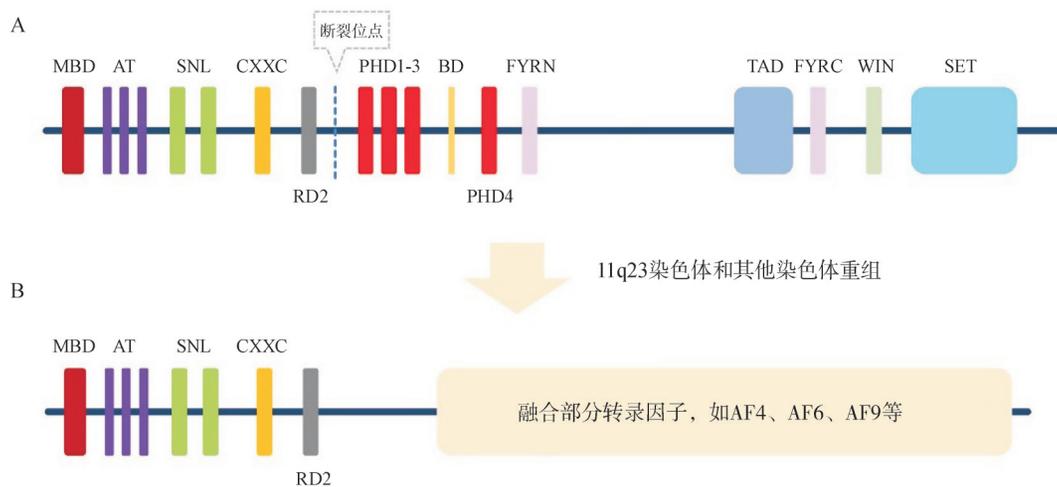


图2 染色体重组导致 MLL1 融合蛋白的形成

A:全长的野生型 MLL1 蛋白;B:MLL 融合蛋白

1.3 MLL1-WDR5 PPI

WT-MLL1是MLL1-FPs相关白血病发生、发展和维持所不可或缺的。*MLL*基因重排仅发生在一个等位基因上,MLL1-FPs的靶基因是WT-MLL1靶基因的子集。若野生型*MLL*基因被敲除,仅MLL1-FPs无法诱导和维持白血病^[37-39]。首先,MLL1-FPs缺少了WT-MLL1的C端部分,缺乏与转录调控相关结构域,如PHD3结构域(图2)。PHD3可识别并结合H3K4me2和H3K4me3。WT-MLL1的PHD3通过与CXXC-PAF_c协同工作,招募野生型MLL1复合物到*Hox*基因,激活*Hox*基因,并阻止调控基因表达的遏制剂“ESET”和*Hox*基因结合,创造一个更适合MLL1-FPs结合的染色质状态。在WT-MLL1存在的情况下,MLL-AF9等MLL1-FPs被招募到*Hox*基因,持续激活*Hox*基因进而诱导白血病发生^[25]。H3K4me2和H3K4me3标记需要WT-MLL1复合物维持完整的生理功能。H3K4me2和H3K4me3标记是MLL1-FPs的主要结合位点,降低染色质H3K4me2和H3K4me3水平可以影响MLL1-FPs对肿瘤的诱导作用^[38-39]。

破坏MLL1甲基转移酶复合物正常的生理功能,降低H3K4的甲基化水平,减少MLL1-FPs的结合位点,从而降低MLL1-FPs被招募到靶基因的概率是治疗融合蛋白诱导的白血病的策略之一。WDR5是MLL1甲基转移酶复合物的核心组件,是

MLL1复合物发挥正常生理功能的基石之一。WDR5通过和MLL1的Win序列相互作用,招募MLL1复合物的其他成员(RbBP5、Ash2L和DPY-30)组成功能完整的MLL1甲基转移酶复合物(图1-B),并稳定其构象^[40-41]。单独的MLL1蛋白只能缓慢地催化H3K4的单甲基化。在缺乏WDR5的情况下,即使其他MLL1复合物组成部分存在,MLL1也无法发挥其完整的甲基转移酶活性^[40-41]。因此WDR5是MLL1发挥完整的甲基转移酶活性以及进一步二甲基化和三甲基化H3K4的必要条件。阻断MLL1-WDR5 PPI,降低MLL1甲基转移酶活性,进一步降低组蛋白H3K4的甲基化是治疗MLL1-FPs诱导白血病的潜在方法。而近些年小分子抑制剂的研发也证明了该方法的可行性^[42]。

2 靶向MLL1-WDR5 PPI的抑制剂

2.1 MLL1-WDR5 PPI抑制剂的作用位点

WDR5是典型的WD40重复域蛋白家族的成员。总体呈游泳圈状,有7个反式 β 螺旋桨域,每个叶片由4个反式平行的 β 折叠组成,其中每个叶片以保守的丝氨酸-组氨酸(SH)开始,以色氨酸-天冬氨酸(WD)结束,大小为34 kD。7个结构域环绕在一起组成一个贯穿蛋白质顶部和底部的中心腔(图3)^[43-44]。

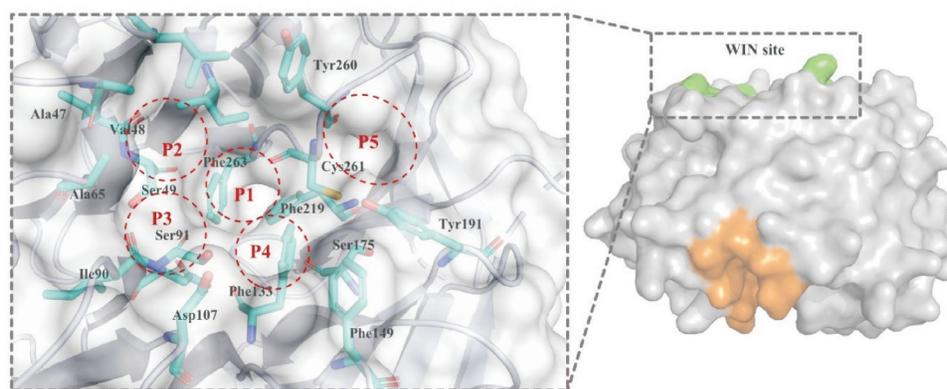


图3 WDR5的结构和MLL1-WDR5 PPI抑制剂的主要作用位点

MLL1-WDR5相互作用界面位于WDR5蛋白的顶部,被7个七叶 β -螺旋桨域包围^[45-46]。WDR5的该空腔和MLL1的Win序列(MLL1上一段包含精氨酸的保守序列)相互作用,故又被成为Win-Site,此位点是干扰MLL1-WDR5蛋白-蛋白相互作用抑制

剂的主要作用位点。本文中根据小分子与WDR5蛋白的结合方式将此位点的结合界面分为5个结合口袋——P1~P5,其中,P1是位于空腔深处的精氨酸结合口袋,又称为氢键网络区。该口袋是特征口袋,所有MLL1-WDR5 PPI抑制剂结构中都包含了

能和 P1 口袋相互作用的碱性基团或精氨酸模拟片段^[47-48]。P2 是一个疏水口袋,而 P3 与 P2 相邻,P3 中的极性氨基酸残基 Asp107 对小分子与蛋白的结合有巨大的贡献。P4 由 Phe133、Phe149 和 Asp107 组成,P5 由 Tyr191、Cys261、Tyr260 和 Lys259 组成的疏水口袋。P5 是小分子与 WDR5 相互作用的热区。整个相互作用界面是可塑的,小分子和蛋白的结合

对口袋的形状变化都有诱导作用^[47,49]。

靶向 MLL1-WDR5 PPI 抑制剂最早报道于 2010 年,距今已有十多年的研发历史。根据小分子的结构和类型分类主要有拟肽类、多取代苯基哌嗪类、芳香五元杂环类(后两者的分类主要依据氢键网络区的结合基团结构而定)以及基于这些化合物衍生的工具分子(图 4)。

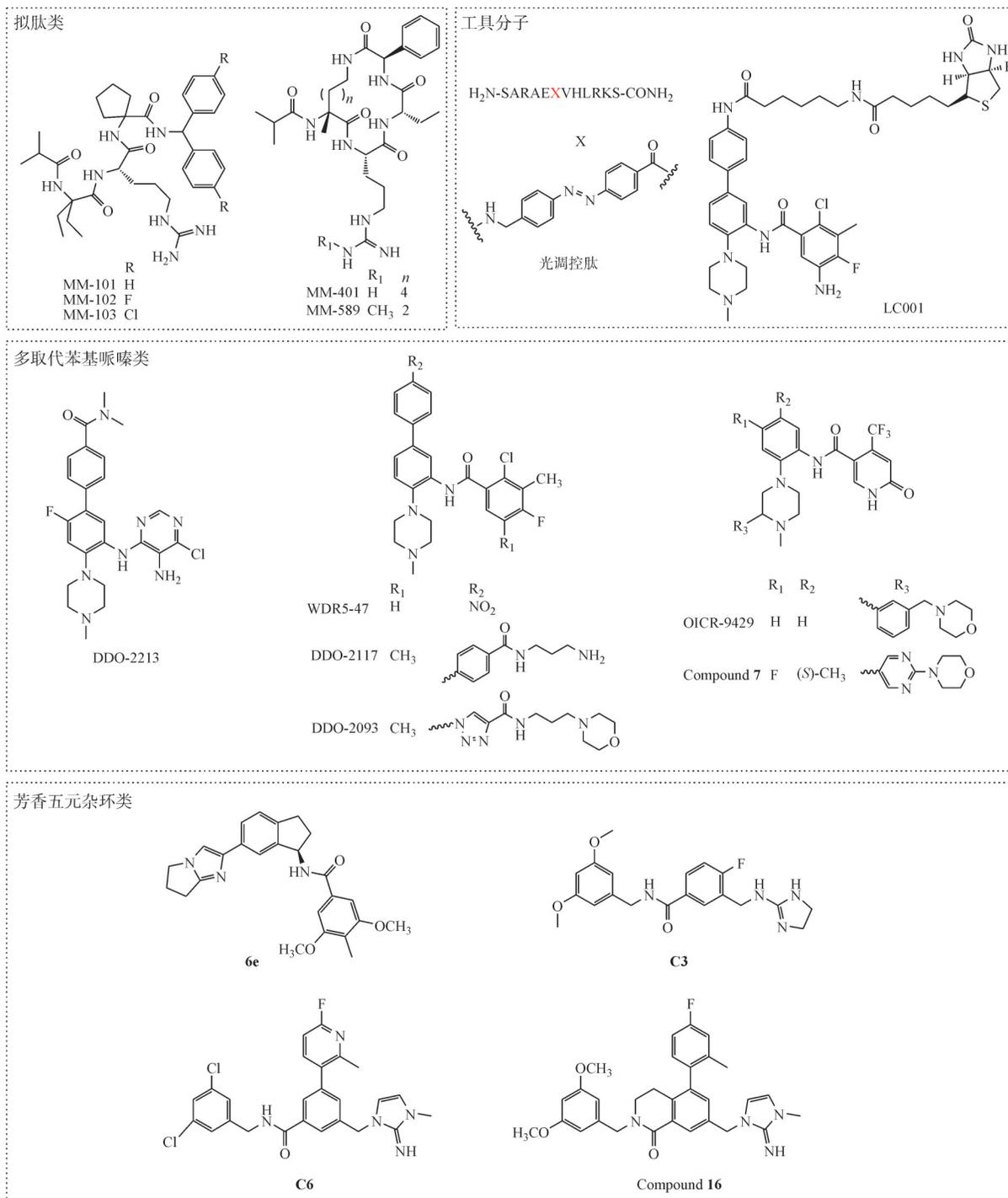


图 4 不同类型的代表 MLL1-WDR5 蛋白-蛋白相互作用(PPI)抑制剂

2.2 拟肽类 MLL1-WDR5 PPI 抑制剂

肽类和拟肽类小分子抑制剂主要由美国密歇根大学的王少萌课题组开发。其通过使用多肽的基序简化,将 MLL1 中的 WIN motif 简化为三肽 Ac-ARA-NH₂ ($K_i = 120 \text{ nmol/L}$)^[50-51]。为进一步提高三肽活性,王少萌课题组替换并修饰了 Ala1 和 Ala3,然后在 N-端和 C-端引入合适的疏水基团,得到拟肽 MM-101、MM-102 和 MM-103 (图 5)。MM-101 和 MM-102 的精氨酸胍基深入氢键结合口袋 P1, 疏水

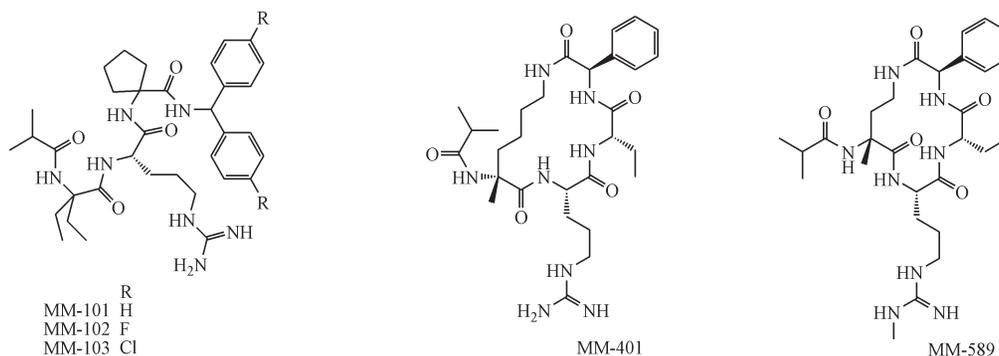


图5 拟肽类 MLL1-WDR5 PPI 抑制剂

王少萌课题组继续对拟肽 MM-101 进行改造得到了环状拟肽 MM-401 ($IC_{50} = 0.9 \text{ nmol/L}$, 图 5)。将 MM-401 连接成环的脂肪链代替了 MM-102 疏水链的作用,和其他疏水侧链共同占据了 P4 口袋 (图 6-A), MM-401 的甲基转移酶活性 ($IC_{50} = 0.32 \text{ } \mu\text{mol/L}$) 相比于 MM-101 和 MM-102 提高近 400 倍。MM-401 对含有 MLL 融合基因的人白血病细胞株 ($GI_{50MV4-11(MLL-AF4)} = 12.42 \text{ } \mu\text{mol/L}$, $GI_{50Molm13(MLL-AF9)} = 23.97 \text{ } \mu\text{mol/L}$, $GI_{50Kopn8(MLL-enl)} = 29.73 \text{ } \mu\text{mol/L}$) 的抑制能力有大幅度的提高,但是依然处于中等水平^[52]。基于 MM-401,他们进一步在精氨酸胍基末端 N 原子引入甲基,并缩短环肽连接链得到 MM-589。甲基取代的胍基通过水介导的氢键和 P1 相互作用。MM-589 以更小的环形成一个更紧凑的立体结构,几个分子内氢键降低构象的灵活性,使苯环以近乎平行的方式和 Tyr260 的苯环相互作用 (图 6-B)。MM-589 靶标活性没有显著的提高,但是其 MLL1 甲基转移酶活性大幅提高, IC_{50} 为 12.7 nmol/L , 其代谢稳定性适中 ($t_{1/2} = 60 \text{ min}$)。MM-589 对具有 MLL 易位的人 AML 细胞系 Molm13 和 MV4-11 细胞的抑制 IC_{50} 分别达到 0.21 和 $0.25 \text{ } \mu\text{mol/L}$, 有良好的选择性,是

碳链和脂肪环占据了 P2、P3 两个疏水口袋,其活性提高了 200 倍 ($IC_{50} = 2.4 \text{ nmol/L}$)。MM-102 对 MLL1 H3K4 甲基转移酶 (MLL1 HMT) 的抑制活性并不高 ($IC_{50} = 141 \text{ } \mu\text{mol/L}$),但是它仍能降低 MLL1 介导的白血病发生过程中重要基因 *HoxA9* 和 *Meis-1* 的表达,并且可以选择性抑制 MLL1 融合型白血病细胞的生长以及诱导细胞凋亡,而对只含 WT-MLL1 蛋白的白血病细胞作用较弱。MM-102 首次证实了靶向 MLL1-WDR5 PPI 的可行性和有效性^[42]。

迄今为止报道的活性最高的靶向 MLL1-WDR5 PPI 的拟肽抑制剂^[53]。

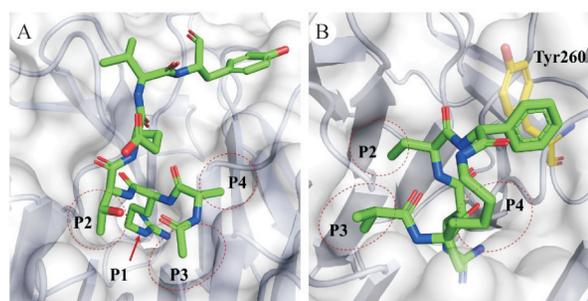


图6 WDR5 与多肽和拟肽的结合模式对比

A: WIN motif 和 WDR5 的结合模式 (PDB: 2H14); B: MM-589 和 WDR5 的结合模式 (PDB: 5VFC)

2.3 多取代苯基哌嗪类 MLL1-WDR5 PPI 抑制剂

多取代苯基哌嗪类化合物来自于筛选得到的小分子化合物 WDR5-0102, 该化合物由 Guillermo 课题组^[54] 基于荧光偏振高通量筛选所得, 经过 Al-Awar 课题组^[55] 进一步修饰, 得到了甲基哌嗪苯类的先导化合物 WDR5-47 (图 7)。多取代苯基哌嗪类化合物根据苯环上取代基的不同又可以细分为苯甲酰胺类、嘧啶氨基苯类和三氟甲基吡啶酮类。

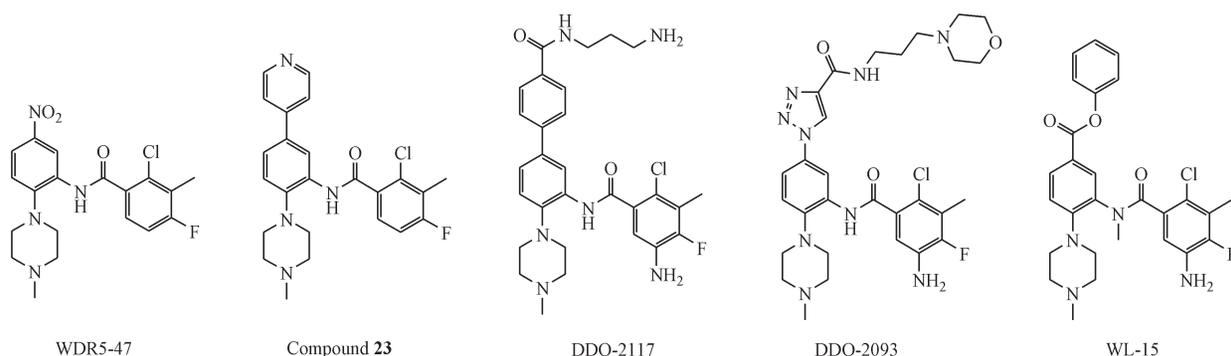


图 7 苯甲酰胺类 MLL1-WDR5 PPI 抑制剂

2.3.1 苯甲酰胺类化合物 WDR5-0102 结构中包含了和精氨酸结合口袋结合的 *N*-甲基哌嗪,哌嗪和中心苯环相连,邻位则是苯甲酰胺基。因此 WDR5-0102 是第一个苯甲酰胺类化合物。WDR5-0102 靶标结合活性适中、结构简单,是优良的苗头化合物 ($K_d = 3.0 \pm 1 \mu\text{mol/L}$)^[54]。在 WDR5-0102 的基础上,Al-Awar 课题组通过晶体结构指导结构改造,他们保留了 WDR5-0102 上的 *N*-甲基哌嗪,进一步修饰了苯甲酰胺部分的 2-氯苯基,原苯环 3 位和 4 位分别引入甲基和 F 原子,得到了 WDR5-47。WDR5-47 的靶标结合活性提高 25 倍 ($\text{IC}_{50} = 0.27 \pm 0.1 \mu\text{mol/L}$)。其甲基和 F 原子占据了 P2 和 P3,增强了口袋中疏水相互作用。在生理 pH 条件下,质子化的 *N*-甲基哌嗪基锚定在 P1 底部,酰胺键与 Ser91 的侧链和 Cys261 的主链氮原子分别形成直接和间接的氢键相互作用(图 8)^[55]。

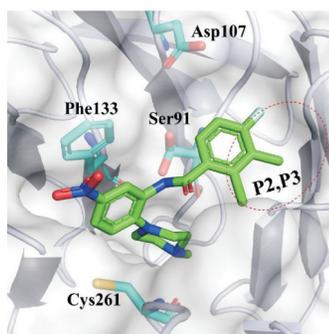


图 8 WDR5-47 和 WDR5 的结合模式 (PDB:4IA9)

基于 WDR5-47,中国药科大学的尤启冬课题组在 WDR5-47 的中心苯环的 5 位使用吡啶替换硝基得到了化合物 **23**,其靶标活性进一步提升 ($\text{IC}_{50} = 104 \text{ nmol/L}$)^[56]。之后尤启冬课题组又将吡啶替换为 4-氨酰苯基,并在原苯酰胺苯环 5' 位上引入氨基得到 DDO-2117(图 7)。DDO-2117 苯酰

胺上的氨基通过氢键与 Asp107 相互作用。长链的伯胺深入溶剂区,增强和溶剂区的作用。DDO-2117 具有较好的靶标活性 ($K_d = 13.6 \text{ nmol/L}$, $\text{IC}_{50} = 7.6 \text{ nmol/L}$),可以显著抑制 MV4-11 细胞的生长 ($\text{GI}_{50} = 7.6 \mu\text{mol/L}$)^[56]。

除 DDO-2117 外,尤启冬课题组还使用其他策略对 WDR5-47 进行优化,获得了 2 个不同结构的苯甲酰胺类化合物(图 7): DDO-2093 和 WL-15。DDO-2093 和 WL-15 分别使用三氮唑和酚酯基取代 DDO-2117 的中心苯环上的氨酰苯基,DDO-2093 有纳摩尔范围的靶标活性 ($\text{IC}_{50} < 10 \text{ nmol/L}$),并且有中等的细胞抗增殖活性。这两类化合物都有较好的甲基转移酶抑制活性和体外抗增殖活性,都可以下调 *Hox* 和 *Meis-1* 基因,并诱导白血病细胞凋亡。其中,DDO-2093 相比于 DDO-2117,其水溶性和安全性均得到较大提高,其首次在小鼠体内移植瘤模型中证明了有效性^[57]。

2.3.2 嘧啶氨基苯类化合物 同样基于化合物 WDR5-47,尤启冬课题组使用骨架跃迁策略得到了嘧啶氨基苯类化合物,通过将 WDR5-47 的苯甲酰胺基团替换为 4-氯-5-氨基取代嘧啶,中心苯环硝基取代为 4-(*N,N*-二甲氨酰)苯基,并在中心苯环 5 号位引入 F 原子得到了 DDO-2213(图 9)。DDO-2213 具有较好的靶标活性,和 DDO-2093 一样,DDO-2213 具有中等的 MLL1 甲基转移酶抑制活性以及体外抗增殖活性,可以下调 *Hox* 和 *Meis-1* 基因,并诱导白血病细胞凋亡。同时,DDO-2213 的有效性也在小鼠体内移植瘤模型中得到证明^[58]。

2.3.3 三氟甲基吡啶酮类化合物 在 WDR5-47 的结构基础上,Al-Awar 课题组根据片段筛选,将取代苯甲酰胺替换为 4-(三氟甲基)吡啶酮,并将

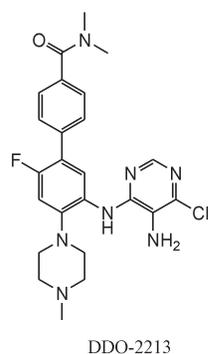


图9 嘧啶氨基苯类 MLL1-WDR5 PPI 抑制剂

WDR5-47 的硝基替换为 3-甲基吗啉取代的苯环得到 OICR-9429 (图 10), 这是第 1 个三氟甲基吡啶酮类化合物。与 WDR5-47 相比, OICR-9429 有更高的靶标活性 ($K_d = 0.03 \mu\text{mol/L}$)、更优的溶解度和更佳的选择性。此外, OICR-9429 不仅能够抑制 MLL1 融合蛋白型白血病的细胞株的生长, 还可抑制表达带有 N 末端 C/EBP α 突变 ($\text{IC}_{50} \approx 5 \mu\text{mol/L}$) 的 p30 的原代人 AML 细胞的增殖^[48]。

在 OICR-9429 的基础上, Al-Awar 课题组继续

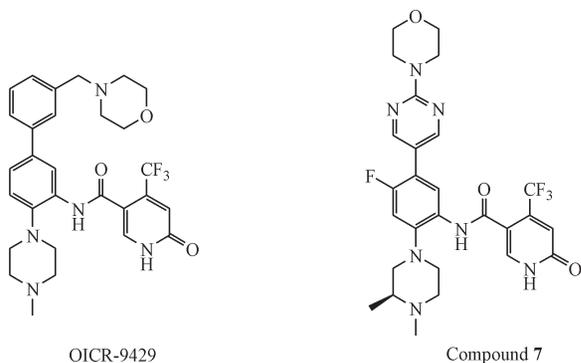


图10 三氟甲基吡啶酮类 MLL1-WDR5 PPI 抑制剂

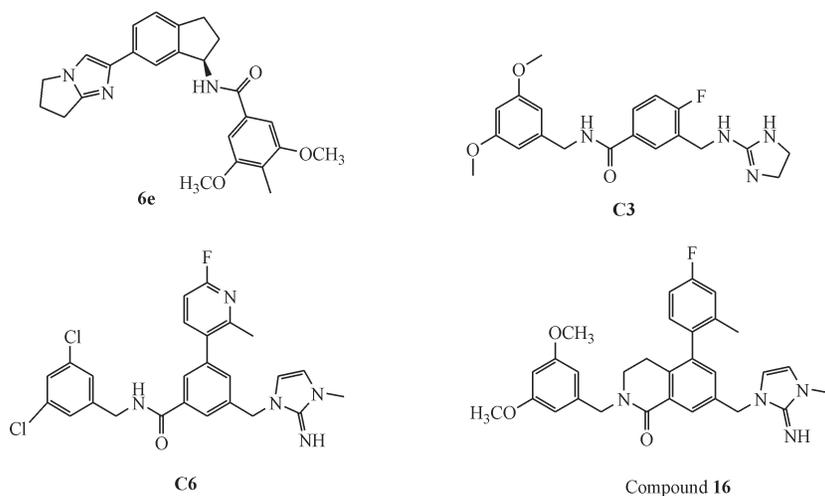


图11 芳香五元杂环类 MLL1-WDR5 PPI 抑制剂

优化了靶标活性和成药性。在中心苯环 C-4 处的引入 F 原子, 并使用 4-(嘧啶-2-基)吗啉取代中心苯环 C-5 处的 4-苄基吗啉, 同时在 N-甲基哌嗪的 2 号位引入甲基后得到化合物 7。化合物 7 是第一个皮摩尔级别的 MLL1-WDR5 PPI 抑制剂 ($K_d = 0.06 \text{ nmol/L}$), 有小于百纳摩尔的体外抗增殖活性 (MV4-11)^[59]。关于化合物 7 后期结构优化已有专利^[60]报道, 但在结构上改动较小且活性增强有限。

2.4 芳香五元杂环类 MLL1-WDR5 PPI 抑制剂

2018 年, Fesik 课题组^[47,62]基于碎片筛选和碎片生长得到了新的芳香五元杂环类抑制剂。该类抑制剂的特征就是使用五元杂环替代以往抑制剂中的 N-甲基哌嗪和精氨酸胍基与 P1 口袋结合。相比于 N-甲基哌嗪芳香五元杂环和 P1 结合的更为深入, 并诱导之前并未参与小分子相互作用的 Phe263 和五元芳香杂环形成了 $\pi-\pi$ 相互作用。相比于甲基哌嗪苯类化合物, 芳香五元杂环类化合物分子整体柔性更强, 且结合模式有较大的不同。

Fesik 课题组基于 NMR 的片段筛选得到了抑制剂的基本片段——2-苯基-6,7-二氢-5H-吡咯并 [1,2-a]咪唑。环状咪唑基团占据 P1 并与 Phe133 和 Phe263 形成 $\pi-\pi$ 堆叠, 咪唑 3 号氮原子通过氢键和 Cys261 的羰基相互作用。进而在苯环 3 号位引入苄基取代的苯甲酰胺将化合物的结合区扩展 P5, 并通过构象限制进一步优化获得化合物 6e (图 11)。与 OICR-9429, DDO-2117 相比, 化合物 6e 和 WDR5 的 (PDB ID: 6DAS) 结合模式不同。化合物 6e 是一类新的 MLL1-WDR5 PPI 抑制剂, 有较好的

靶标活性(FPA $K_i < 1$ nmol/L, TR-FRET $K_i = 0.902$ nmol/L), 和中等的体外抗增殖活性($GI_{50(MV-4-11)} = 7.25$ μ mol/L)^[47]。

2019年, Fesik 课题组基于碎片筛选得到了另一种结构的 MLL1-WDR5 PPI 抑制剂。他们得到了初始精氨酸模拟片段——咪唑胺结构, 使用苄基酰胺将分子延伸至 P5, 通过修饰苄基以增强和 P5 的相互作用, 并在中心苯环上引入 F 指向 P2 得到化合物 **C3**。同时筛选到的另一个片段——5-(1*H*-咪唑-3-甲基)糠醛酸, 他们将酸和苄胺缩合以利用苄基占据 P5 口袋, 并用 2-氟-6-甲基吡啶代替 F 来占据 P2, 在原有咪唑的 C-2 位引入亚氨基增强和氢键网络区的相互作用得到化合物 **C6**, 因此靶标活性也更高^[61]。基于化合物 **C6**, Fesik 课题组继续优化了和 P2 和 P5 结合的基团, 替换原来的基团为 4-氟-2-甲基苯和 3,5-二甲氧基苯。然后中心苯环替换为二氢异喹啉酮, 通过构象限制调整取代苄基和 P5 的结合角和方向, 并改善化合物的体内代谢稳定性, 最终得到化合物 **16**。晶体结构表明, 咪唑亚胺深入 P1 口袋中, 通过 π - π 堆叠相互作用被 Phe133 和 Phe263 夹在中间。亚胺氮原子通过与水分子和 Cys261 形成双齿氢键, 4-氟-2-甲基苯基和 3,5-二甲氧基苯基分别占据的 P2 和 P5 口袋。化合物 **16** 和 **C6** 有相同水平的靶标活性, 可诱导 P53 表达和 P53 依赖性细胞凋亡(图 12)。相比化合物 **C6**, 化合物 **16** 的细胞效价和成药性大幅提升, 体外抗增殖活性 GI_{50} 均小于 100 nmol/L。除 MLL 细胞系外, 化合物 **16** 还可抑制其他类型的肿瘤细胞的增殖, 如胰腺导管癌细胞^[62]。

2.5 基于抑制剂的工具分子

2017年, Vázquez 课题组报道了基于多肽类光调控 WIN site 抑制剂。抑制剂基于 WIN motif, 引

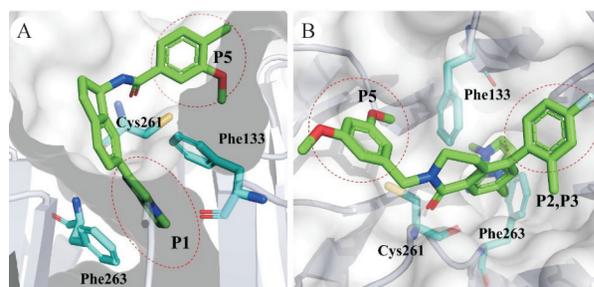


图 12 WDR5 和芳香五元杂环类抑制剂的相互作用
A: 化合物 **6b**(**6e** 同系列化合物)和 WDR5 的结合模式(PDB:6DAS);
B: 化合物 **16** 和 WDR5 的结合模式(PDB:6UCS)

入 4-(4'-氨基苯基偶氮)苯甲酸(AMPB)作为光调控元件, 获得靶标活性较好的光控制剂($K_i = 1.24$ nmol/L)。用光处理后, 抑制剂的顺反异构发生改变, 导致靶标活性变化, 体外 MLL1 的甲基转移酶活性也随之改变。化合物以微摩尔 GI_{50} 抑制小鼠骨髓细胞的增殖, 顺式和反式异构体之间有明显的活性差异^[63]。2018年, 基于 DDO-2117, 使用连接链在末端游离氨基上引入生物素标签获得了小分子探针 LC001。该探针靶标活性和 DDO-2117 相近, IC_{50} 为 17 nmol/L, 具有类似于小分子抑制剂 DDO-2117 的生理作用, 是一种新的工具分子(图 13)^[64]。2019年, 有专利报道了靶向 WDR5 的 PROTAC 分子, 这项工作主要基于安大略省肿瘤研究所发现的一系列小分子。通过将分子(OICR-9429)与不同的泛素 E3 连接酶底物通过各种类型的连接链连接而获得了大量 PROTAC 分子。PROTAC 显著地诱导了 WDR5 蛋白的降解, 并表现出比对应小分子更好的体外抗增殖活性^[65]。

3 总结与展望

本文对靶向 MLL1-WDR5 蛋白-蛋白相互作用的小分子抑制剂的药理学机制以及 WDR5 蛋白 Win-site 结合位点结构信息进行了总结, 介绍了已公开的各个结构类型的 MLL1-WDR5 蛋白-蛋白相互作用小分子抑制剂。经过十几年的发展, 人们对 MLL1 的生理功能日趋了解, 靶向 MLL1 的新途径也不断被发现。MLL1-WDR5 蛋白-蛋白相互作用作为肿瘤治疗的新策略越来越受到研究者的关注, 目前针对 MLL1-WDR5 PPI 抑制剂的开发依然处于前期研究阶段, 尚未有小分子抑制剂进入临床研究, 但已有多个候选化合物涌现。

MLL1-WDR5 PPI 抑制剂的研究虽已取得较好的进展, 亦具有较大的开发潜力, 但依然存在一些不足。首先, 目前报道的分子虽然数量较多, 但结构类型较为单一, 并且无论是多肽类抑制剂还是非肽类的小分子抑制剂都含有较强的碱性基团(哌嗪、胍基和含氮芳香五元杂环等), 这些结构特征可能导致分子成药性不佳(如多肽类分子体内代谢稳定性和透膜性较差、部分多取代苯基哌嗪类小分子的极性较强)。其次, 部分 MLL1-WDR5 PPI 抑制剂虽然具有较好的体外活性, 但目前体内研究的数据较少, 现有抑制剂的有效性还需要更

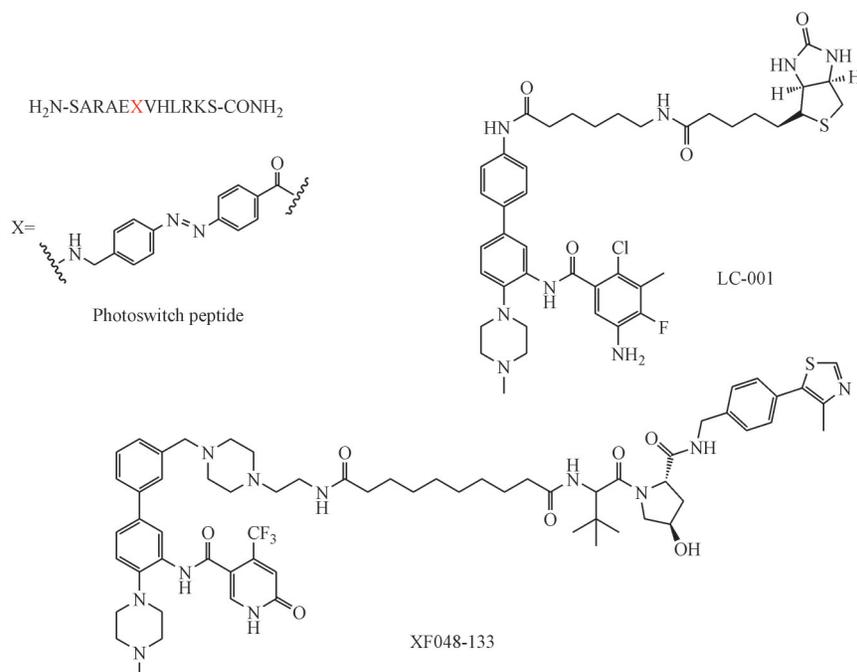


图 13 基于 MLL1-WDR5 PPI 抑制剂的工具分子

多的实验支撑。因此,针对 MLL1-WDR5 PPI 抑制剂的研究,不仅要在原有分子的基础上继续优化其成药性,还需寻找更多结构新颖的小分子抑制剂,同时抑制剂的体内有效性也有待进一步阐明。此外,利用新策略研发出更多的工具分子,可以为进一步探究 MLL1 相关的生物学机制提供分子基础。

除了靶向 MLL1-WDR5 蛋白-蛋白相互作用,在 WDR5 蛋白上发现了另外一个蛋白结合空腔^[44,66],该空腔可以介导 WDR5 和 RbBP5 的相互作用。研究发现,抑制该相互作用也可以抑制 MLL1 甲基转移酶的活性。但该抑制剂是否确切有效暂时还未见报道,但此项研究为后续两者协同用药提供可能,为靶向 MLL1 提供了更多的途径和策略。

References

- [1] Ling C, Rönn T. Epigenetics in human obesity and type 2 diabetes[J]. *Cell Metab*, 2019, **29**(5): 1028-1044.
- [2] Cromby J, Chung E, Papadopoulos D, et al. Reviewing the epigenetics of schizophrenia[J]. *J Ment Heal*, 2019, **28**(1): 71-79.
- [3] Duruisseaux M, Esteller M. Lung cancer epigenetics: from knowledge to applications [J]. *Semin Cancer Biol*, 2018, **51**: 116-128.
- [4] Eckschlager T, Plch J, Stiborova M, et al. Histone deacetylase

inhibitors as anticancer drugs[J]. *Int J Mol Sci*, 2017, **18**(7): 1414.

- [5] Jones PA, Issa JPJ, Baylin S. Targeting the cancer epigenome for therapy[J]. *Nat Rev Genet*, 2016, **17**(10): 630-641.
- [6] Jones PA, Baylin SB. The epigenomics of cancer [J]. *Cell*, 2007, **128**(4): 683-692.
- [7] Berger SL, Kouzarides T, Shiekhattar R, et al. An operational definition of epigenetics[J]. *Genes Dev*, 2009, **23**(7): 781-783.
- [8] Sheikhpour M, Maleki M, Ebrahimi Vargoorani M, et al. A review of epigenetic changes in asthma: methylation and acetylation[J]. *Clin Epigenetics*, 2021, **13**(1): 65.
- [9] Hyun K, Jeon J, Park K, et al. Writing, erasing and reading histone lysine methylations[J]. *Exp Mol Med*, 2017, **49**(4): e324.
- [10] Kaniskan HU, Martini ML, Jin J. Inhibitors of protein methyltransferases and demethylases [J]. *Chem Rev*, 2018, **118**(3): 989-1068.
- [11] Ruthenburg AJ, Allis CD, Wysocka J. Methylation of lysine 4 on histone H3: intricacy of writing and reading a single epigenetic mark[J]. *Mol Cell*, 2007, **25**(1): 15-30.
- [12] Guenther MG, Jenner RG, Chevalier B, et al. Global and hox-specific roles for the MLL1 methyltransferase [J]. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2005, **102**(24): 8603-8608.
- [13] Dou Y, Milne TA, Tackett AJ, et al. Physical association and coordinate function of the H3K4 methyltransferase MLL1 and the H4K16 acetyltransferase MOF [J]. *Cell*, 2005, **121**(6): 873-885.
- [14] Daigle SR, Olhava EJ, Theriksen CA, et al. Potent inhibition of dot1l as treatment of MLL-fusion leukemia [J]. *Blood*, 2013,

- 122(6):1017-1025.
- [15] Grembecka J, He S, Shi A, *et al.* Menin-MLL1 inhibitors reverse oncogenic activity of MLL fusion proteins in leukemia [J]. *Nat Chem Biol*, 2012, **8**(3):277-284.
- [16] Hess JL. MLL: a histone methyltransferase disrupted in leukemia[J]. *Trends Mol Med*, 2004, **10**(10):500-507.
- [17] Glaser S, Schaft J, Lubitz S, *et al.* Multiple epigenetic maintenance factors implicated by the loss of MLL2 in mouse development[J]. *Development*, 2006, **133**(8):1423-1432.
- [18] Butler LH, Slany R, Cui X, *et al.* The *HRX* proto-oncogene product is widely expressed in human tissues and localizes to nuclear structures[J]. *Blood*, 1997, **89**(9):3361-3370.
- [19] Tkachuk DC, Kohler S, Cleary ML. Involvement of a homolog of drosophila trithorax by 11q23 chromosomal translocations in acute leukemias[J]. *Cell*, 1992, **71**(4):691-700.
- [20] Cosgrove MS, Patel A. Mixed lineage leukemia: a structure-function perspective of the MLL1 protein[J]. *FEBS J*, 2010, **277**(8):1832-1842.
- [21] Gu Y, Nakamura T, Alder H, *et al.* The T(4;11) chromosome translocation of human acute leukemias fuses the ALL-1 gene, related to drosophila trithorax, to the AF-4 gene[J]. *Cell*, 1992, **71**(4):701-708.
- [22] Yokoyama A, Kitabayashi I, Ayton PM, *et al.* Leukemia proto-oncoprotein MLL is proteolytically processed into 2 fragments with opposite transcriptional properties [J]. *Blood*, 2002, **100**(10):3710-3718.
- [23] Argiropoulos B, Humphries RK. Hox genes in hematopoiesis and leukemogenesis[J]. *Oncogene*, 2007, **26**(47):6766-6776.
- [24] Dou Y, Hess JL. Mechanisms of transcriptional regulation by MLL and its disruption in acute leukemia [J]. *Int J Hematol*, 2008, **87**(1):10-18.
- [25] Milne TA, Kim J, Wang GG, *et al.* Multiple interactions recruit MLL1 and MLL1 fusion proteins to the *hoxa9* locus in leukemogenesis[J]. *Mol Cell*, 2010, **38**(6):853-863.
- [26] Chang PY, Hom RA, Musselman CA, *et al.* Binding of the MLL1 PHD3 finger to histone H3K4me3 is required for MLL-dependent gene transcription [J]. *J Mol Biol*, 2010, **400**(2):137-144.
- [27] McMahon KA, Hiew SY, Hadjur S, *et al.* MLL has a critical role in fetal and adult hematopoietic stem cell self-renewal[J]. *Cell Stem Cell*, 2007, **1**(3):338-345.
- [28] Ansari KI, Kasiri S, Mandal SS. Histone methylase MLL1 has critical roles in tumor growth and angiogenesis and its knock-down suppresses tumor growth *in vivo* [J]. *Oncogene*, 2013, **32**(28):3359-3370.
- [29] Scharf S, Zech J, Bursen A, *et al.* Transcription linked to recombination: a gene-internal promoter coincides with the recombination hot spot II of the human MLL gene[J]. *Oncogene*, 2007, **26**(10):1361-1371.
- [30] Yu BD, Hanson RD, Hess JL, *et al.* MLL, a mammalian trithorax-group gene, functions as a transcriptional maintenance factor in morphogenesis[J]. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 1998, **95**(18):10632-10636.
- [31] Winters AC, Bernt KM. MLL-rearranged leukemias-an update on science and clinical approaches [J]. *Front Pediatr*, 2017, **5**:4.
- [32] Ayton PM, Cleary ML. Molecular mechanisms of leukemogenesis mediated by MLL fusion proteins [J]. *Oncogene*, 2001, **20**(40):5695-5707.
- [33] Meyer C, Kowarz E, Hofmann J, *et al.* New insights to the MLL recombinome of acute leukemias [J]. *Leukemia*, 2009, **23**(8):1490-1499.
- [34] Luo Z, Lin C, Shilatifard A. The super elongation complex (SEC) family in transcriptional control [J]. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 2012, **13**(9):543-547.
- [35] Nguyen AT, Zhang Y. The diverse functions of Dot1 and H3K79 methylation[J]. *Genes Dev*, 2011, **25**(13):1345-1358.
- [36] Muntean AG, Hess JL. The pathogenesis of mixed-lineage leukemia[J]. *Annu Rev Pathol*, 2012, **7**:283-301.
- [37] Milne TA, Martin ME, Brock HW, *et al.* Leukemogenic MLL fusion proteins bind across a broad region of the *Hox a9* locus, promoting transcription and multiple histone modifications [J]. *Cancer Res*, 2005, **65**(24):11367-11374.
- [38] Thiel AT, Blessington P, Zou T, *et al.* MLL-AF9-induced leukemogenesis requires coexpression of the wild-type MLL allele[J]. *Cancer Cell*, 2010, **17**(2):148-159.
- [39] Wang QF, Wu G, Mi S, *et al.* MLL fusion proteins preferentially regulate a subset of wild-type MLL target genes in the leukemic genome[J]. *Blood*, 2011, **117**(25):6895-6905.
- [40] Dou Y, Milne TA, Ruthenburg AJ, *et al.* Regulation of MLL1 H3K4 methyltransferase activity by its core components [J]. *Nat Struct Mol Biol*, 2006, **13**(8):713-719.
- [41] Patel A, Dharmarajan V, Vought VE, *et al.* On the mechanism of multiple lysine methylation by the human mixed lineage leukemia protein-1 (MLL1) core complex [J]. *J Biol Chem*, 2009, **284**(36):24242-24256.
- [42] Karatas H, Townsend EC, Cao F, *et al.* High-affinity, small-molecule peptidomimetic inhibitors of MLL1/WDR5 protein-protein interaction[J]. *J Am Chem Soc*, 2013, **135**(2):669-682.
- [43] Grebien F, Vedadi M, Getlik M, *et al.* Pharmacological targeting of the WDR5-MLL interaction in C/EBP α n-terminal leukemia [J]. *Nat Chem Biol*, 2015, **11**(8):571-578.
- [44] Odho Z, Southall SM, Wilson JR. Characterization of a novel WDR5-binding site that recruits RbBP5 through a conserved motif to enhance methylation of histone H3 lysine 4 by mixed lineage leukemia protein-1 [J]. *J Biol Chem*, 2010, **285**(43):32967-32976.
- [45] Gregory GD, Vakoc CR, Rozovskaia T, *et al.* Mammalian ASH1L is a histone methyltransferase that occupies the transcribed region of active genes [J]. *Mol Cell Biol*, 2007, **27**(24):8466-

- 8479.
- [46] Chen Z, Yan CT, Dou Y, *et al.* The role of a newly identified SET domain-containing protein, SETD3, in oncogenesis [J]. *Haematologica*, 2013, **98**(5): 739-743.
- [47] Wang F, Jeon KO, Salovich JM, *et al.* Discovery of potent 2-aryl-6, 7-dihydro-5 h-pyrrolo [1, 2-a] imidazoles as WDR5-win-site inhibitors using fragment-based methods and structure-based design [J]. *J Med Chem*, 2018, **61**(13): 5623-5642.
- [48] Getlik M, Smil D, Zepeda-Velázquez C, *et al.* Structure-based optimization of a small molecule antagonist of the interaction between WD repeat-containing protein 5 (WDR5) and mixed-lineage leukemia 1 (MLL1) [J]. *J Med Chem*, 2016, **59**(6): 2478-2496.
- [49] Zhang P, Lee H, Brunzelle JS, *et al.* The plasticity of WDR5 peptide-binding cleft enables the binding of the SET1 family of histone methyltransferases [J]. *Nucleic Acids Res*, 2012, **40**(9): 4237-4246.
- [50] Patel A, Vought VE, Dharmarajan V, *et al.* A conserved arginine-containing motif crucial for the assembly and enzymatic activity of the mixed lineage leukemia protein-1 core complex [J]. *J Biol Chem*, 2008, **283**(47): 32162-32175.
- [51] Karatas H, Townsend EC, Bernard D, *et al.* Analysis of the binding of mixed lineage leukemia 1 (MLL1) and histone 3 peptides to WD repeat domain 5 (WDR5) for the design of inhibitors of the MLL1-WDR5 interaction [J]. *J Med Chem*, 2010, **53**(14): 5179-5185.
- [52] Cao F, Townsend EC, Karatas H, *et al.* Targeting MLL1 H3K4 methyltransferase activity in mixed-lineage leukemia [J]. *Mol Cell*, 2014, **53**(2): 247-261.
- [53] Karatas H, Li Y, Liu L, *et al.* Discovery of a highly potent, cell-permeable macrocyclic peptidomimetic (MM-589) targeting the WD repeat domain 5 protein (WDR5)-mixed lineage leukemia (MLL) protein-protein interaction [J]. *J. Med. Chem.*, 2017, **60**(12): 4818-4839.
- [54] Senisterra G, Wu H, Allali-Hassani A, *et al.* Small-molecule inhibition of MLL activity by disruption of its interaction with WDR5 [J]. *Biochem J*, 2013, **449**(1): 151-159.
- [55] Bolshan Y, Getlik M, Kuznetsova E, *et al.* Synthesis, optimization, and evaluation of novel small molecules as antagonists of WDR5-MLL interaction [J]. *ACS Med Chem Lett*, 2013, **4**(3): 353-357.
- [56] Li DD, Chen WL, Xu XL, *et al.* Structure-based design and synthesis of small molecular inhibitors disturbing the interaction of MLL1-WDR5 [J]. *Eur J Med Chem*, 2016, **118**: 1-8.
- [57] Chen WL, Chen X, Li DD, *et al.* Discovery of a potent MLL1 and WDR5 protein-protein interaction inhibitor with *in vivo* antitumor activity [J]. *Eur J Med Chem*, 2021, **223**: 113677.
- [58] Chen WL, Chen X, Li DD, *et al.* Discovery of DDO-2213 as a potent and orally bioavailable inhibitor of the WDR5-mixed lineage leukemia 1 protein-protein interaction for the treatment of MLL fusion leukemia [J]. *J Med Chem*, 2021, **64**(12): 8221-8245.
- [59] Rima AA, Methvin I, Babu J, *et al.* Inhibitor of WDR5 protein-protein binding: WO2017147700A1 [P]. 2017-09-08.
- [60] Rima AA, Methvin I, Babu J, *et al.* Inhibitor of WDR5 protein-protein binding: WO2019046944A1 [P]. 2019-03-04.
- [61] Aho ER, Wang J, Gogliotti RD, *et al.* Displacement of WDR5 from chromatin by a WIN site inhibitor with picomolar affinity [J]. *Cell Rep*, 2019, **26**(11): 2916-2928.e13.
- [62] Tian JH, Teuscher KB, Aho ER, *et al.* Discovery and structure-based optimization of potent and selective WD repeat domain 5 (WDR5) inhibitors containing a dihydroisoquinolinone bicyclic core [J]. *J Med Chem*, 2020, **63**(2): 656-675.
- [63] Albert L, Xu J, Wan RW, *et al.* Controlled inhibition of methyltransferases using photoswitchable peptidomimetics: towards an epigenetic regulation of leukemia [J]. *Chem Sci*, 2017, **8**(6): 4612-4618.
- [64] Chen WL, Li DD, Wang ZH, *et al.* Design, synthesis, and initial evaluation of affinity-based small molecular probe for detection of WDR5 [J]. *Bioorg Chem*, 2018, **76**: 380-385.
- [65] Jian J, Dongxu L, Jing L, *et al.* Wd40 repeat domain protein 5 (WDR5) degradation/destruction compound and method of use: WO2019246570A1 [P]. 2019-12-26.
- [66] Avdic V, Zhang P, Lanouette S, *et al.* Structural and biochemical insights into MLL1 core complex assembly [J]. *Structure*, 2011, **19**(1): 101-108.